

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИЗУЧЕНИЯ ВОЗДЕЙСТВИЯ УФ-ОБЛУЧЕНИЯ НА ФОТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ БЕЛОК КОЖИ

И.А. САВЧЕНКО, Т.Г. РУКША, В.В. САЛМИН, Л.Д. ЗЫКОВА

Results of an experimental study of the UV radiation effect on the photosensitive skin protein

I.A. SAVCHENKO, T.G. RUKSHA, V.V. SALMIN, L.D. ZYKOVA

Об авторах:

И.А. Савченко — лаборант каф. патофизиологии с курсом клинической патофизиологии Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого

Т.Г. Рукша — зав. каф. патофизиологии с курсом клинической патофизиологии Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, д.м.н.

В.В. Салмин — доцент кафедры экспериментальной и медицинской физики Сибирского федерального университета, к.ф.-м.н.

Л.Д. Зыкова — зав. каф. патологической анатомии Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, д.м.н., профессор

TsPO (18 кД транслокатор белок) является фоточувствительным белком, регулирующим процессы клеточной пролиферации и апоптоза. Изменение конформационных свойств TsPO коррелирует с интенсивностью пролиферации клеток. С помощью иммуногистохимического анализа изучали изменения уровня TsPO в коже крыс после УФ-облучения. Обнаружено, что в дозе 200 Дж/м² происходит однонаправленное повышение уровня TsPO и маркера клеточной пролиферации PCNA в коже. УФ-излучение в дозах 400—600 Дж/м² индуцирует снижение экспрессии TsPO и PCNA. Таким образом, возможно участие TsPO в регуляции изменений интенсивности клеточной пролиферации в коже при воздействии УФ-излучения.

Ключевые слова: клеточная пролиферация, TsPO, PCNA, УФ-излучение.

TsPO (18 kDa translocator protein) is a photosensitive protein regulating processes of skin proliferation and apoptosis. Changes in the conformational properties of TsPO correlate with the intensity of cell proliferation. Changes in the TsPO level in the rats' skin after exposure to UV radiation were assessed with the use of immunohistochemical staining. It was revealed that the dose of 200 J/m² causes a unidirectional increase in the TsPO and PCNA (a cell proliferation marker) levels in the skin. UV radiation in the doses of 400—600 J/m² induces a reduction of TsPO and PCNA expression. Thus, there is a possibility that TsPO participates in the regulation of changes in the intensity of cell proliferation in the skin under the exposure to UV radiation.

Key words: cell proliferation, TsPO, PCNA, UV radiation.

Ультрафиолетовое излучение является фактором, индуцирующим развитие злокачественных новообразований кожи. Реализация эффектов УФ-излучения в коже осуществляется, в том числе, посредством воздействия на фоточувствительные белки, их структуру и функциональную активность. К таким белковым молекулам, обладающим фоточувствительностью, относится TsPO (18 кД транслокатор белок), ранее известный как периферический бензодиазепиновый рецептор. TsPO принимает участие в регуляции пролиферации клеток, апоптоза, а также синтеза стероидных гормонов [1]. TsPO экспрессируется в коже в кератиноцитах, ме-

ланоцитах, а также в дермальных эндотелиоцитах и фибробластах [2]. Как известно, при воздействии УФ-излучения происходит полимеризация белка, что сопряжено с изменением его функциональной активности [3]. Нами было показано, что при воздействии УФ-излучения диапазона В в дозах 120—360 Дж/м² в клетках меланомы происходила полимеризация TsPO, а облучение в дозе 480 Дж/м² вызывало деполимеризацию данного белка, которая коррелировала со снижением интенсивности пролиферации клеток меланомы [4]. Помимо этого, нами было выявлено, что лиганды TsPO обладают способностью модулировать интенсивность клеточной пролиферации в культуре кератиноцитов и меланоцитов, полученных из кожи здоровых добровольцев, а также в клетках меланомы и плоскоклеточного рака кожи [5]. Таким образом, TsPO может являться

потенциально новой терапевтической мишенью для коррекции изменений интенсивности клеточной пролиферации, что в свою очередь может быть востребованным в дерматоонкологии.

Цель исследования: определение уровня экспрессии TsPO, а также интенсивности клеточной пролиферации и апоптоза в коже крыс после воздействия УФ-излучения.

Материал и методы

Моделирование воздействия УФ-излучения *in vivo* осуществлялось на белых беспородных крысах-самцах массой 220—240 г, содержащихся в стандартных условиях вивария, с соблюдением правил гуманного обращения с животными. Предварительно у животных удаляли волосяной покров в области воздействия. В качестве источника УФ-света использовалась лампа с эмиссией излучения в диапазоне волн 240—400 нм. Сформированы 6 групп (по 6 животных в каждой группе) и контрольная группа ($n = 7$): крысы 1 и 2-й групп подвергали УФ-облучению в дозе 200 Дж/м², 3 и 4-й групп — в дозе 400 Дж/м², 5 и 6-й — в дозе 600 Дж/м². Через 24 ч. брали биоптаты кожи у крыс 1, 3, 5-й групп, через 72 ч. — у крыс 2, 4, 6-й групп. Биоптаты кожи крыс фиксировали в 10% нейтральном формалине, заливали в парафин, после чего готовили срезы для иммуногистохимического окрашивания. Использовались антитела к TsPO (Trevigen, разведение 1:200), PCNA (Novocastra, разведение 1:400). Оценивали число TsPO+ и PCNA+ клеток на 100 клеток эпидермиса. Для определения выраженности апоптоза использовался TUNEL-метод, основанный на регистрации характерной для апоптоза фрагментации ДНК, выполнение которого осуществлялось согласно инструкции производителя (Mebstain Apoptosis Kit Direct, Immunotech). Статистическая оценка результатов производилась с помощью Т-критерия Манна—Уитни и коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

Результаты исследования

TsPO+ клетки определялись гомогенно во всех слоях эпидермиса, с характерной перинуклеарной локализацией (рис. 1). УФ-излучение в дозе 200 Дж/м² индуцировало увеличение экспрессии TsPO, в то время как облучение в дозах 400—600 Дж/м² приводило к обратному эффекту, а именно к снижению экспрессии TsPO в кератиноцитах. Уровень клеточной пролиферации, определяемый по числу PCNA+ клеток (рис. 2), возрастал через 24 ч. при воздействии УФ-излучения в дозе 200 Дж/м², а через 72 ч. при той же дозе облучения показатели интенсивности клеточной пролиферации не отличались от контрольных величин. УФ-излучение в дозах 400—600 Дж/м² вызывало снижение интенсивности пролиферации кератиноцитов. Между уровнем экспрессии TsPO и PCNA в кератиноцитах была

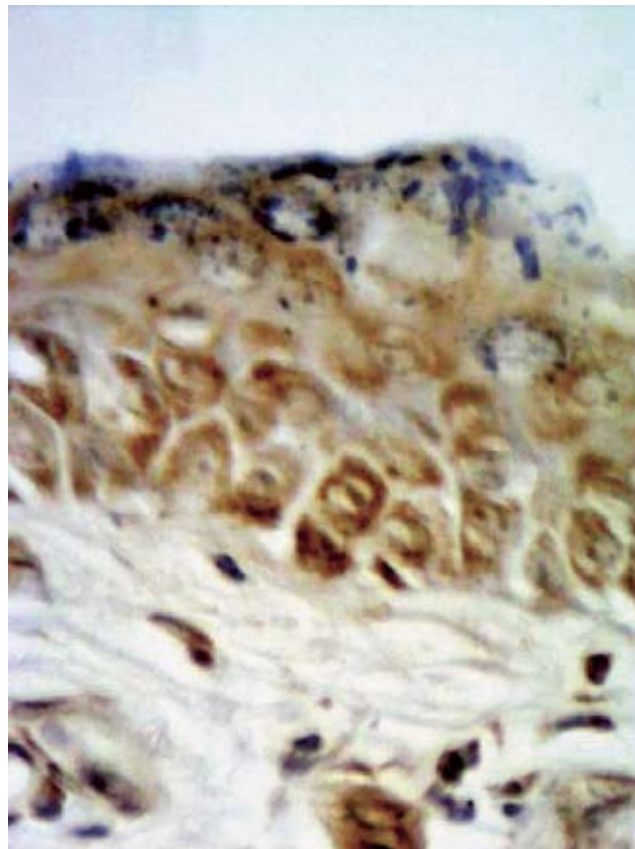


Рис. 1. Экспрессия TsPO в эпидермисе кожи крыс через 72 ч. после воздействия УФ-излучения в дозе 600 Дж/м². $\times 600$

выявлена положительная корреляционная связь ($r = 0,96$; $\alpha = 0,01$; см. таблицу).

С учетом известного апоптозomodулирующего действия УФ-излучения с помощью TUNEL-метода изучали выраженность апоптоза клеток в коже крыс при облучении максимальной из тестируемых доз — 600 Дж/м² через 72 ч. после воздействия. При этом апоптотических кератиноцитов в эпидермисе обнаружено не было, однако TUNEL+ клетки определялись в сосудах дермы. На основании чего был сделан вывод, что максимальный апоптозindуцирующий эффект УФ-излучения в исследуемой дозе проявлялся на уровне дермы.

Таким образом, в зависимости от дозы УФ-излучение оказывало разнонаправленное действие на экспрессию TsPO и интенсивности клеточной пролиферации в коже. В дозе 200 Дж/м² УФ-излучение индуцировало увеличение тестируемых показателей, в дозах 400—600 Дж/м², наоборот, вызывало снижение экспрессии TsPO и PCNA.

Известно, что УФ-излучение оказывает разнонаправленное действие на кожу, модулируя активность различных ее компонентов, структурных белков и сигнальных молекул. Так, через 48 ч. по-

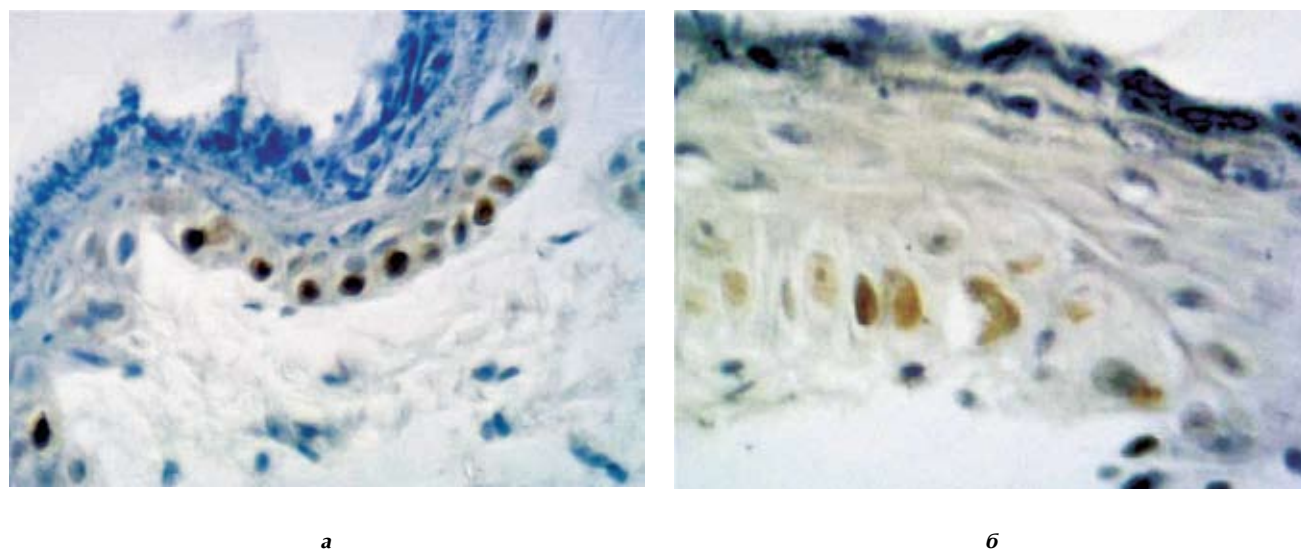


Рис. 2. Экспрессия PCNA в эпидермисе кожи контрольных (а) и подопытных животных через 72 ч. после УФ-облучения в дозе 600 Дж/м² (б). × 600

Таблица 1

Изменение уровня TsPO и PCNA в коже крыс после УФ-облучения

Показатель	Контроль	Доза УФ-излучения					
		200 Дж/м ²		400 Дж/м ²		600 Дж/м ²	
		через 24 ч.	через 72 ч.	через 24 ч.	через 72 ч.	через 24 ч.	через 72 ч.
TsPO, %	77,6	88,1*	86,3*	74,2*	73,3*	62,0*	70,1*
PCNA, %	14,1	19,0*	14,8	9,0*	10,8*	11,3*	4,9*

* Достоверно по отношению к контролю, $\alpha = 0,05$.

сле УФ-облучения возникает активация рецептора эпидермального фактора роста, который оказывает супрессивное действие на апоптоз кератиноцитов и активирует пролиферацию клеток посредством стимуляции сигнального каскада, включающего внеклеточные сигнализационные киназы, киназу p38, фосфотидилинозитол-3-киназу [6]. Помимо этого УФ-излучение индуцирует высвобождение кератиноцитами интерлейкина-10, который оказывает иммуносупрессивное действие, ингибируя способность презентации антигена клетками Лангерганса [7]. Показано, что УФ-излучение диапазона В в первую очередь вызывает изменения, опосредованные Т-хелперами 1-го типа: снижает уровень интерлейкина-12, модулирует уровень фактора некроза опухоли- α , интерлейкинов-1, -6 [8]. Напротив, эффект УФ-излучения диапазона А опосредован генерацией активных форм кислорода, в первую очередь синглетного кислорода. Синглетный кислород играет ключевую роль в развитии апоптоза Т-хелперов, индуцированного УФ-излучением диапазона А [9].

Показано, что УФ-излучение с длиной волны 254 нм вызывает полимеризацию TsPO. Авторы полагали, что индуктором образования полимеров выступали активные формы кислорода, тем более что была обнаружена корреляция между их уровнем и степенью образования полимеров [3]. Как отмечалось выше, нами было показано, что УФ-излучение с длиной волны 302 нм также вызывает полимеризацию рецептора в дозах 120—360 Дж/м², в то время как при облучении в дозе 480 Дж/м² происходит деполимеризация рецептора, что также ассоциировано с двухфазным изменением клеточной пролиферации [4]. Таким образом, можно предположить, что в проведенном экспериментальном исследовании двухфазный эффект действия УФ-излучения на экспрессию TsPO также связан с изменением конформации рецептора и может быть обусловлен повышением уровня активных форм кислорода в коже под воздействием УФ-света. В таком случае TsPO может являться мишенью для активных форм кислорода, под воздействием которых изменяется струк-

тура рецептора, его функциональная активность и, как следствие, интенсивность клеточной пролиферации. Активным формам кислорода отводят важную роль в индукции канцерогенеза, в особенности в коже [10, 11]. Помимо этого считается, что повышенные уровни активных форм кислорода в клетках рака молочной железы определяют характер инвазивности и метастазирования опухоли [12]. Активные формы кислорода вызывают мутации дипиримидиновых участков ДНК генов *gas* и *p53*, что является одним из ключевых событий в развитии плоскоклеточного рака кожи [13, 14].

Таким образом, возможно, что УФ-излучение реализует эффекты воздействия на динамику клеточного цикла посредством влияния на конформационную стабильность и функциональную активность TsPO. Вклад TsPO в реализацию эффектов УФ-излучения может быть учтен при формировании патогенетических принципов терапии и профилактики заболеваний, индуцируемых воздействием УФ-излучения.

Литература

1. Veenman L., Papadopoulos V., Gavish M. Channel-like functions of the 18-kDa translocator protein (TSPO): regulation of apoptosis and steroidogenesis as part of the host-defense response. *Current Pharmaceutical Design*. 2007; 13: 2385—2405.
2. Рукша Т.Г., Салмина А.Б., Максимова Т.В. и др. Экспрессия периферического бензодиазепинового рецептора и уровень PCNA при базально-клеточной карциноме. *Росс. журн. кож. и венерич. болезней*. 2007; 2: 4—7.
3. Delavoie F., Li H., Hardwick M. et al. In vivo and in vitro peripheral-type benzodiazepine receptor polymerization: functional significance in drug ligand and cholesterol binding. *Biochemistry* 2003; 42: 4506—4519.
4. Рукша Т.Г. Изменение структуры периферического бензодиазепинового рецептора в клетках меланомы кожи после воздействия ультрафиолетовым излучением. *Росс. онкол. журн.* 2008; 6: 22—24.
5. Рукша Т.Г. Лиганд периферических бензодиазепиновых рецепторов PK11195 модулирует пролиферацию клеток кожи. *Бюллетень СО РАМН*. 2007; 1: 35—39.
6. El-Abaseri T.B., Putta S., Hansen L.A. Ultraviolet irradiation induces keratinocyte proliferation and epidermal hyperplasia through the activation of the epidermal growth factor receptor. *Carcinogenesis* 2006; 27: 225—231.
7. Beissert S., Ullrich S.E., Hosoi J. et al. Supernatants from UVB radiation-exposed keratinocytes inhibit Langerhans cell presentation of tumor-associated antigens via IL-10 content. *J. of Leukoc. Biol.* 1995; 58: 234—240.
8. Boonstra A., Oudenaren A., Barendregt B. et al. UVB irradiation modulates systemic immune responses by affecting cytokine production of antigen-presenting cells. *International Immunology*. 2000; 12: 1531—1538.
9. Morita A., Werfel T., Stege H. et al. Evidence that singlet oxygen-induced human T helper cell apoptosis is the basic mechanism of ultraviolet-A radiation therapy. *J Exper Med* 1997; 186: 1763—1768.
10. Toyokuni S. Novel aspects of oxidative stress-associated carcinogenesis. *Antioxidants & Redox Signaling* 2006; 8: 1373—1377.
11. Trouba K.J., Hamadeh H.K., Amin R.P. et al. Oxidative stress and its role in skin disease. *Antioxidants & Redox Signaling* 2002; 4: 665—673.
12. Brown N.S., Bicknell R. Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Oxidative stress: its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer. *Breast Cancer Research* 2001; 3: 323—327.
13. Shim M., Powers K.L., Ewing S.J. et al. Diminished expression of C/EBP α in skin carcinomas is linked to oncogenic Ras and reexpression of C/EBP α in carcinoma cells inhibits proliferation. *Cancer Research* 2005; 65: 861—867.
14. Nishigori C., Hattori Y., Toyokuni S. Role of reactive oxygen species in skin carcinogenesis. *Antioxidants & Redox Signaling* 2004; 6: 561—570.